

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No  
PCT/FR 99/01908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 G01N33/68 C12Q1/68 C12N15/62  
C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBEST4 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC: AA880300, 30 March 1998 (1998-03-30) MARRA M ET AL.: "Mus musculus cDNA clone 1277601" XP002100073 abstract	2,3
X	--- DATABASE EMBEST2 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC/ID: AA651757, 8 November 1997 (1997-11-08) NCI-CGAP: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1188695" XP002126887 abstract --- -/--	2,3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 2000

Date of mailing of the international search report

18/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No

PCT/FR 99/01908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEDECS ET AL: "Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP - 1 tyrosine phosphatase" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 352, no. 2, 15 July 1997 (1997-07-15), pages 449-454, XP002094565 cited in the application the whole document	1-10
A	NAHMIAS C ET AL: "The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function." TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, (1995 JUL) 16 (7) 223-5. REF: 28 JOURNAL CODE: WFT. ISSN: 0165-6147., XP002100074 cited in the application the whole document	1-10
A	TIRODE ET AL: "A CONDITIONALLY EXPRESSED THIRD PARTNER STABILIZES OR PREVENTS THE FORMATION OF A TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR IN A THREE-HYBRID SYSTEM" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 37, no. 272, 1997, page 22995-22999 XP002051283 cited in the application the whole document	11-20
P,X	DATABASE R61U002 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC AL096842, 14 July 1999 (1999-07-14) WAMBUTT R ET AL.: "Homo sapiens mRNA, cDNA DKFZp586D1519" XP002126888 abstract	2,3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 99/01908

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/12 C07K14/47 G01N33/68 C12Q1/68 C12N15/62 C07K16/18			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K C12N G01N C12Q			
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)			
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents		no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBEST4 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC: AA880300, 30 mars 1998 (1998-03-30) MARRA M ET AL.: "Mus musculus cDNA clone 1277601" XP002100073 abrégé</p>		2,3
X	<p>DATABASE EMBEST2 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC/ID: AA651757, 8 novembre 1997 (1997-11-08) NCI-CGAP: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1188695" XP002126887 abrégé</p>		2,3
--- -/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
5 janvier 2000		18/01/2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Oderwald, H	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 99/01908

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BEDECS ET AL: "Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP - 1 tyrosine phosphatase"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 352, no. 2, 15 juillet 1997 (1997-07-15), pages 449-454, XP002094565 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>NAHMIAS C ET AL: "The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function."</p> <p>TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, (1995 JUL) 16 (7) 223-5. REF: 28 JOURNAL CODE: WFT. ISSN: 0165-6147., XP002100074 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>TIRODE ET AL: "A CONDITIONALLY EXPRESSED THIRD PARTNER STABILIZES OR PREVENTS THE FORMATION OF A TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR IN A THREE-HYBRID SYSTEM"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 37, no. 272, 1997, page 22995-22999 XP002051283 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11-20
P,X	<p>DATABASE R61U002 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC AL096842, 14 juillet 1999 (1999-07-14) WAMBUTT R ET AL.: "Homo sapiens mRNA, cDNA DKFZp586D1519" XP002126888 abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	2,3

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp644/34P	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01908	Date du dépôt international (jour/mois/année) 02/08/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 04/08/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/02/2000	Date d'achèvement du présent rapport 09.11.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Renggli-Zulliger, N N° de téléphone +49 89 2399 7482 

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01908

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-24                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-20                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/14-14/14              version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01908

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-20
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-20
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-20
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: DATABASE EMBL4 [Online] EMBL, Heidelberg, Germany AC: AA880300, 30 mars 1998 (1998-03-30) MARRA M ET AL.: 'Mus musculus cDNA clone 1277601'.

D2: DATABASE EMBL2 [Online] EMBL, Heidelberg, Germany AC/ID: AA651757, 8 novembre 1997 (1997-11-08) NCI-CGAP: 'Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1188695'.

*Nouveauté (Article 33(1) et (2) PCT)*

1) Le document D1 décrit un EST (Accession number AA880300) long de 500 pb qui est 99.8% identique à la Seq. ID n°1 (1803pb) sur 500pb, 99.8% Seq. ID n°3 sur 500pb, 100% identique à la Seq. ID n°5 sur 278pb, 82.6% identique à la Seq. ID n°9 sur 236 pb.

Le document D2 décrit un EST (Accession number AA651757) long de 614pb qui est 99.5% identique à la Seq. ID n°7 sur 614 pb.

2) Etant donné qu'aucun de ces fragments n'est 100% identique sur toute sa longueur aux séquences revendiquées (Seq. ID n°1, 3, 5, 7, 9), l'objet de la revendication 1 est nouveau.

3) Les séquences de D1 et de D2 faisant plus de 400pb, l'objet des revendications 2 et 3 est nouveau.

4) Quant aux autres documents cités dans l'état de la technique, ils ne comprennent aucunes des Seq. ID 1-12. Par conséquent, les anticorps, vecteurs, cellules hôtes, méthode de screening 2 ou 3 hybrides ainsi que l'usage de cellules hôtes pour le criblage utilisant ces nouvelles séquences sont nouveaux.

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-20 est nouveau au vu des documents cités



dans le rapport de recherche internationale.

*Activité inventive (Article 33(1) et (3) PCT)*

5) La fonction des séquences décrites dans D1 et D2 n'est pas connue et l'état de la technique cité dans le rapport de recherche internationale (RRI) ne mentionne ni ne suggère l'existence d'un ligand naturel tel que ATIP. C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-20 implique une activité inventive au vu de l'état de la technique cité dans le rapport de recherche internationale.

**Concernant le point VIII**

**Observations relatives à la demande internationale**

1) Le terme "homologue" utilisé dans la revendication 2 n'est pas clair (article 6 PCT) car le pourcentage d'homologie pour une séquence homologue comme utilisé dans la revendication 2 n'étant pas précisé explicitement, n'importe quelle séquence pourra être considérée comme homologue même si elle n'a aucune relation structurelle avec la séquence nucléotidique revendiquée.

2) Les conditions d'hybridisation pour les amorces ou pour les sondes (i.e. les conditions de stringence de l'hybridation) n'étant pas précisées dans la revendication 2, n'importe quel fragment de 20-400pb pourrait être utilisé comme sonde pour les séquences ID n°1, 3, 5, 7, 9 en basse stringence et ce, même si il n'y a qu'une très faible homologie entre la sonde/amorce et ces séquences.

3) La formulation "l'extrémité C terminale" utilisée dans les revendications 11-17 n'est pas claire au sens de l'article 6 PCT, car on ne connaît pas la localisation exacte de "la partie C-terminale" (position nucléotides/acides aminés) dans la séquence revendiquée, ce qui rend les limites de la revendication mal définies.

4) Le terme "en particulier" employé dans la revendication 19 n'introduit pas d'effet limitatif sur la portée de la revendication, ce qui revient à dire que la caractéristique qui suit une telle expression doit être considérée comme entièrement facultative.

2<sup>me</sup>  
7 09/1762194.  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BLOcp644/34P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01908	International filing date (day/month/year) 02 August 1999 (02.08.99)	Priority date (day/month/year) 04 August 1998 (04.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 29 February 2000 (29.02.00)	Date of completion of this report 09 November 2000 (09.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01908

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-24, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-20, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/14-14/14, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01908

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: DATABASE EMBL [Online] EMBL, Heidelberg, Germany AC: AA880300, 30 March 1998 (1998-03-30) MARRA M ET AL.: 'Mus musculus cDNA clone 1277601';

D2: DATABASE EMBL [Online] EMBL, Heidelberg, Germany AC/ID: AA651757, 8 November 1997 (1997-11-08) NCI-CGAP: 'Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1188695'.

*Novelty (PCT Article 33(1) and (2))*

1) Document D1 describes an EST (Accession number AA880300) 500pb long which is 99.8% identical to the Seq. ID No.1 (1803pb) on 500pb, 99.8% identical to the Seq. ID No.3 on 500pb, 100% identical to the Seq. ID No.5 on 278pb, and 82.6% identical to the Seq. ID No.9 on 236pb. Document D2 describes an EST (Accession number AA651757) 614pb long which is 99.5% identical to the Seq. ID No.7 on 614pb.

2) Given that none of these fragments is 100% identical

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01908

over the whole of its length to the claimed sequences (Seq. ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9), the subject matter of Claim 1 is novel.

3) Since the sequences of D1 and D2 have more than 400pb, the subject matter of Claims 2 and 3 is novel.

4) The other cited prior art documents do not contain any of the sequences Seq. ID Nos. 1-12. Consequently, the antibodies, vectors, host cells, method of screening 2 or 3 hybrids and the use of host cells for screening purposes using these novel sequences are novel.

For that reason, the subject matter of Claims 1 to 20 is novel over the documents cited in the international search report.

*Inventive step (PCT Article 33(1) and (3))*

5) The function of the sequences described in D1 and D2 is not known and the prior art cited in the international search report (ISR) neither mentions nor suggests the existence of a natural ligand such as ATIP. For that reason, the subject matter of Claims 1 to 20 involves an inventive step with respect to the prior art cited in the international search report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/01908

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1) The term "homologous" used in Claim 2 is unclear (PCT Article 6) since, given that the percentage of homology for a homologous sequence as used in Claim 2 is not explicitly specified, any sequence can be considered homologous even if it has no structural relationship with the claimed nucleotide sequence.

2) Since the hybridization conditions for the primers or probes (i.e. the stringency conditions for hybridization) are not specified in Claim 2, any 20-400pb fragment could be used as a probe for the sequences ID Nos. 1, 3, 5, 7 and 9 at low stringency, even if there is only very limited homology between the probe/primer and these sequences.

3) The wording "C-terminal end" used in Claims 11 to 17 is unclear within the meaning of PCT Article 6, since the exact location of the "C-terminal portion" (nucleotides/amino acids position) in the claimed sequence is unknown, and therefore the limits of the claim are poorly defined.

4) The expression "in particular" used in Claim 19 does not have a limiting effect on the scope of the claim, which means that the feature following such an expression must be regarded as entirely optional.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 mars 2000 (21.03.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/01908	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp644/34P
Date du dépôt international (jour/mois/année) 02 août 1999 (02.08.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 04 août 1998 (04.08.98)
Déposant ELBAZ, Nathalie etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

29 février 2000 (29.02.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 25 mai 2000 (25.05.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp644/34P	
Demande internationale no PCT/FR99/01908	Date du dépôt international (jour/mois/année) 02 août 1999 (02.08.99)

## 1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant    ☐ l'inventeur    ☐ le mandataire    ☐ le représentant commun

Nom et adresse ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNOLOGIE MOLECULAIRE-ADIM 22, rue Méchain F-75014 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

## 2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☒ la personne    ☐ le nom    ☐ l'adresse    ☐ la nationalité    ☐ le domicile

Nom et adresse CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS 3, rue Michel Ange F-75794 Paris Cedex 16 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

## 3. Observations complémentaires, le cas échéant:

## 4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur    ☐ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale    ☒ aux offices élus concernés  
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international    ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: R. Raissi no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---



# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR UNE PROTEINE (ATIP) INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2  
ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à des séquences nucléiques  
5 codant pour une protéine apte à interagir avec le récepteur AT2, à des oligo-  
nucléotides compris dans lesdites séquences, à leurs applications en tant que  
sondes et pour l'expression desdites protéines, aux vecteurs utiles pour ladite  
expression, aux hôtes cellulaires contenant lesdits vecteurs, ainsi qu'à un  
modèle d'étude du récepteur AT2.

10 La présente invention est également relative aux dites pro-  
téines ainsi qu'à leurs applications.

L'octapeptide angiotensine II, principalement connu comme  
régulateur de la pression artérielle, a également été décrit comme un impor-  
tant modulateur de la croissance cellulaire. De façon intéressante ce peptide  
15 semble exercer des effets opposés sur la croissance cellulaire, selon qu'il se lie  
sur l'un ou l'autre de ses deux sous-types de récepteurs membranaires (AT1  
ou AT2).

Le récepteur de sous-type AT2, qui appartient aussi à la  
famille des récepteurs couplés aux protéines G, est encore mal caractérisé tant  
20 du point de vue de ses mécanismes d'activation que de son rôle physiologique  
(C. Nahmias et al., *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16, 223-225). Plusieurs  
arguments suggèrent cependant un rôle de ce récepteur dans les phénomènes  
de prolifération, de différenciation ou d'adhésion cellulaire.

Le récepteur AT2 est fortement exprimé au cours de la vie  
25 foetale, disparaît chez l'adulte dans la plupart des tissus, mais se trouve  
réexprimé dans des conditions pathophysiologiques impliquant la restructu-  
ration des tissus.

Des études réalisées *in vivo* ont mis en évidence le rôle inhibi-  
teur exercé par le sous-type AT2 sur la prolifération des cellules musculaires  
30 de l'intima, après lésion vasculaire (P. Janiak et al., *Hypertension*, 1992, 20, 737-

745 ; M. Nakajima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 10663-10667).

Par ailleurs, la stimulation du récepteur AT2 active la phosphatase SHP-1 (Bedecs K. et al; *Biochem. J.*, 1997, 325, 449-454). Le fait que le récepteur AT2 active une phosphatase est en accord avec ses effets antiprolifé-  
5 ratifs.

Compte tenu de ce qui précède, il a été montré que sur des cellules en culture, le récepteur AT2 :

- inhibe la synthèse d'ADN et la prolifération, induites par l'angiotensine II (Ang II) et le bFGF (M. Stoll et al., *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 651-  
10 657),

- induit l'apoptose (T. Yamada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 156-160) et

- induit la différenciation neuronale (L. Laflamme et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 22729-22735).

15 L'étude des voies de signalisation, associées au récepteur AT2, a été abordée dans les cellules de la lignée N1E-115, dérivées d'un neuroblastome murin, qui n'expriment que le sous-type AT2. Une première étude a permis de mettre en évidence une déphosphorylation rapide et transitoire de certaines protéines sur résidus tyrosine, suite au traitement des cellules N1E-  
20 115 par l'angiotensine II (C. Nahmias et al., *Biochem. J.*, 1995, 306, 87-92). Il a également été montré que le récepteur AT2 interfère avec les voies d'activation des récepteurs aux facteurs de croissance et inhibe l'activité des MAP kinases (ERK1 et ERK2) (*mitogen-activated protein*), qui jouent un rôle clé dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire. L'effet  
25 inhibiteur de l'AT2 sur l'activation des MAP kinases est rapide et transitoire, ne fait pas intervenir une protéine régulatrice sensible à la toxine pertussique (de type Gi/Go), mais implique l'activation d'une tyrosine phosphatase sensible à l'orthovanadate.

Compte tenu du rôle du récepteur AT2 sur la prolifération  
30 cellulaire, les Inventeurs ont cherché à mettre au point des outils aptes à régu-

ler l'action du récepteur AT2. En effet, l'activation du récepteur AT2 peut avoir des répercussions en cancérologie (inhibition de la prolifération cellulaire).

De manière générale, le récepteur AT2 présente des effets inverses de ceux de l'AT1 sur l'activation des MAP kinases et sur la prolifération cellulaire ; l'étude de la communication qui peut exister entre ces deux sous-types de récepteurs, liant le même ligand, présente par conséquent de l'intérêt.

L'étude des voies de signalisation et de la régulation du récepteur AT2 représente également un enjeu important pour la santé humaine sachant qu'aujourd'hui des antagonistes du récepteur AT1 sont administrés aux patients atteints d'hypertension. Dans ce contexte il devient essentiel de connaître les effets biologiques associés au récepteur AT2 qui reste activable par l'Ang II circulante dans ce type de traitement.

La présente invention a pour objet un fragment d'acides nucléiques (ADN ou ARN) isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9, telles que présentées dans la liste des séquences, incluse dans la présente Demande.

Ces différentes séquences correspondent à l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une partie ou la totalité de la protéine ci-après dénommée ATIP (*AT2 interacting protein*).

La séquence SEQ ID NO:1 (1803 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ATIP de souris et inclut aussi bien les parties codant pour la protéine de liaison au récepteur AT2 que les parties non codantes.

La séquence NO:3 (1323 pb) correspond à la séquence en acides nucléiques de la partie codante de la séquence SEQ ID NO:1, alors que la séquence SEQ ID NO:5 correspond au fragment de la séquence NO:1, obtenu par la technique du double-hybride (A. Plessis et al., M/S, 1994, 9, 1-1K ; J. Luban et al., *Curr. Op. Biotechnol.*, 1995, 6, 59-64).

La séquence SEQ ID NO:7 (3742 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ADNc humain et inclut aussi bien les parties codant pour la protéine homologue de l'ATIP de souris que les parties non codantes.

La séquence SEQ ID NO:9 (1308 pb) correspond à la partie  
5 codante de la séquence SEQ ID NO : 7.

La présente invention a également pour objet des transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires des séquences conformes à l'invention et sont notamment générés à partir desdites séquences.

La présente invention a en outre pour objet des fragments  
10 desdites séquences comprenant entre 20 et 400 pb, utiles comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9, ou de séquences homologues.

Parmi lesdits fragments, on peut notamment citer une sonde de 354 pb, (SEQ ID NO:5) ainsi que tout fragment de 20 pb à 400 pb inclus  
15 dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

Comme amorce, on utilisera en particulier la séquence SEQ ID NO:10 (oligonucléotide antisens), qui permet notamment d'amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP (technique du 5' RACE : Marathon cDNA amplification kit, Clontech).

On peut également utiliser comme amorces d'amplification,  
20 tout couple d'oligonucléotides de plus de 20 pb et comprenant une partie de la séquence nucléique ATIP (humaine ou de souris), notamment le couple SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12.

Les conditions préférées d'hybridation (préhybridation et  
25 hybridation) sont notamment les suivantes : 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à une stringence correspondant au tampon : SSCX1, 0,1 % SDS.

La présente invention a également pour objet une protéine  
30 purifiée et isolée, dénommée ATIP, apte à interagir avec le récepteur AT2,

sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8.

Les séquences murines et humaine présentent 85,6 % d'homologies. La séquence humaine (ATIP humain) possède 5 aminoacides de moins que la séquence de souris (ATIP souris). Les acides aminés manquants dans la séquence humaine se situent au niveau des acides aminés : 162, 163, 164, 166 et 214 de la séquence ATIP souris.

Les comparaisons (Blast) entre les séquences protéiques ATIP selon l'invention et les séquences contenues dans les banques de données indiquent que ATIP humain (comme ATIP souris), ne présentent jamais plus de 25 % d'homologie avec une séquence connue, et cela, seulement sur une partie de cette séquence.

La présente invention a également pour objet un produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

La présente invention a en outre pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre la protéine ATIP ou un fragment de protéine ATIP selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur tel que défini ci-dessus.

Parmi les cellules transformées préférées selon l'invention, on peut citer *E. coli* et les cellules CHO.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au moins deux vecteurs qui codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le

groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un

5 facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans

10 une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites cellules,

15 elles sont notamment constituées :

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à

20 l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un poly-

25 peptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à

30 une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à

l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels  
5 vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une  
10 protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une  
15 protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

La présente invention a également pour objet une méthode de  
20 sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à  
25 une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un poly-  
30



peptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- (b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon l'invention, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

Une telle méthode met notamment en œuvre la technique dite du triple-hybride ou du double-hybride inverse, telles que décrites dans Vidal et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 10315-10320 et 10321-10326) ou Tirode et al. (*J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 37, 22995-22999).

La présente invention a également pour objet une méthode de criblage de polypeptides interagissant avec la protéine ATIP selon l'invention, laquelle méthode comprend :

- (a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

- (b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant avec la protéine ATIP, sur un milieu sélectif convenable.

Une telle méthode permet notamment de rechercher d'autres protéines interagissant avec la protéine ATIP, en particulier pour trouver les maillons suivants de la voie activée par le récepteur AT2, en vue de les utiliser pour modifier l'interaction protéine selon l'invention-récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (a) la co-transformation d'une souche de levure convenable  
5 avec deux vecteurs, tels que définis ci-dessus, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un  
10 fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour  
15 une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction ATIP-récepteur AT2.

Une telle méthode permet d'identifier et de délimiter les domaines importants de la protéine ATIP ou de l'extrémité C-terminale du  
20 récepteur AT2, dont dépend leur interaction, afin de les utiliser comme cible privilégiée pour modifier la signalisation du récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

- 25 (a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support avec une protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

- 30 (c) la visualisation de l'éventuelle interaction ATIP-récepteur

AT2, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés soit contre la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2, soit contre le récepteur AT2.

Si la substance à tester inhibe l'interaction ATIP-récepteur  
5 AT2, l'étape de visualisation est négative.

Conformément à l'invention l'ATIP est fixée sur ledit support soit de manière covalente, soit par liaison d'affinité entre une substance de fixation fusionnée à l'ATIP et ledit support. Par exemple, ledit support est constitué de billes couplées, soit à une substance présentant une affinité avec  
10 ladite protéine de fixation, fusionnée à l'ATIP, soit à des anticorps convenables.

La protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette est notamment obtenue à partir d'un lysat de cellules transfectées avec un vecteur exprimant la protéine de fusion AT2-protéine étiquette.

15 En variante, ladite méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon l'invention, comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un  
20 tampon convenable,

(c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps appropriés et

(d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagis-  
25 sant avec la protéine ATIP.

Conformément à ladite méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, il est possible d'utiliser notamment comme protéines de fusion ATIP-protéine étiquette, les protéines GST-ATIPc et MYC-ATIPc, qui constituent des outils  
30 pouvant permettre d'entraîner *in vitro* d'éventuelles protéines interagissant

avec ATIP, par exemple, à partir de lysats cellulaires activés ou non par des ligands du récepteur AT2. La protéine GST-ATIP peut-être entraînée par interaction spécifique du GST avec des billes d'agarose couplées à de la glutathione, ou encore immunoprécipitée avec l'anticorps anti-ATIP. La protéine  
5 Myc-ATIP peut-être immunoprécipitée avec les anticorps anti-MYC commerciaux ou avec l'anticorps anti-ATIP.

L'intérêt de ces méthodes consiste à trouver des moyens de modifier la signalisation, le niveau d'expression ou la pharmacologie du récepteur AT2, ceci pouvant avoir des applications thérapeutiques. En effet  
10 lorsqu'une pathologie aura été corrélée de façon claire à une anomalie de la transduction associée au récepteur AT2, une modification de cette transduction, en particulier en jouant sur la liaison du récepteur AT2 à la protéine selon l'invention, pourra alors éventuellement compenser le désordre pathologique ou au moins l'influencer.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des  
15 cellules co-transformées précitées, pour la sélection et le criblage de substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend  
20 encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 correspond à l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris, utilisée comme appât en double hybride pour cribler une  
25 banque d'ADNc de souris ;

- la figure 2 illustre la position du domaine de liaison GAL4 et le site de clonage multiple du plasmide pGBT9 (Clontech) ;

- la figure 3 illustre les structures présumées *coiled-coil* (surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP de souris ;

30 - la figure 4 illustre les structures présumées *coiled-coil*

(surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP humaine ;

- la figure 5 illustre la structure du plasmide pVP16 ;

- la figure 6 illustre le site de clonage multiple du plasmide

pRSET A ;

5 - la figure 7 illustre la séquence MYC utilisée, pour construire  
le plasmide pcDNA3-MYC ;

- la figure 8 illustre la structure du plasmide pBAC-PAK-poly

HIS,

10 - la figure 9 illustre un Northern blot de plusieurs tissus  
humains hybridés avec la sonde ATIPsouris-court (SEQ ID NO:5) ;

- la figure 10, illustre l'interaction *in vitro* de la protéine  
ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 ; et

- la figure 11 illustre les modifications du signal induit par le  
récepteur AT2 par surexpression de la protéine ATIP.

15 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont  
donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne  
constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1** : Mise en évidence d'une interaction protéine-protéine spéci-  
fique entre le récepteur AT2 et la protéine de séquence SEQ ID NO:6 selon  
20 l'invention.

#### Matériel et méthodes

- Le système double-hybride, initialement développé par Song  
et Fields en 1989 (Nature, 340, 245-246) repose sur le fait que l'activité de  
nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes ne nécessite que  
25 deux domaines : un domaine activateur qui n'a pas la capacité de lier l'ADN  
et un domaine de liaison à l'ADN.

Dans le système double-hybride, le domaine de liaison de  
l'ADN est fusionné à une protéine X et le domaine d'activation est fusionné à  
une protéine Y. Si, et seulement si, X et Y interagissent, un complexe est formé  
30 qui reconstitue un facteur de transcription fonctionnel.

- Construction des vecteurs d'expression :

. vecteurs « appâts »:

Protéine X : extrémité C-terminale de la séquence codant pour le récepteur AT2 de souris (52 aminoacides de CVNPF au codon stop, voir figure 1), fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (figure 2).

Insert : extrémité du récepteur AT2 de souris (159 pb + 16 pb de sites générés par PCR) inséré au niveau des sites EcoRI et BamHI des vecteurs pLEX9 (Clontech) ou pGBT9 (pBTM116 ou pGAD424 modifié; A.B. Vojtek et al., Cell, 1993, 74, 205-214).

On obtient ainsi la séquence suivante :

CGGAATTC coté 5'-AT2 séquence C-terminale de 52 acides aminés-  
GGATCCCCG coté 3'

. Banque criblée :

Banque d'ADNc de fœtus de souris (A.B. Vojtek et al., Cell, 1993, 74, 205-214), contenant des inserts de 350 à 700 pb (protéine Y) dans le vecteur VP16 (figure 5).

. Vecteurs contrôles « appâts »

Protéine X : extrémité C-terminale des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique humain, AT1 de rat ou bradykinine humain.

. Souche de levure transformée

HF7c (Clontech) pour l'appât construit dans pGBT9 ;

L40 pour l'appât construit dans pLex9.

### Résultats

Cette stratégie a permis d'isoler un clone issu de la banque d'ADNc contenant un insert de 354 pb (ATIP) qui interagit de façon spécifique avec l'extrémité C-terminale de l'AT2. Il est intéressant de noter que le criblage de cette banque avec les constructions réalisées dans les deux vecteurs d'expression pGBT9 et pLEX9 a permis de retrouver dans les deux cas ce même clone. Ce clone n'interagit pas avec des protéines contrôles,

d'interactions non spécifiques.

Pour juger de la sélectivité de cette interaction, le clone ATIP a été testé en double-hybride avec les extrémités C-terminales des récepteurs :  $\beta 2$  adrénergique humain, AT1 de rat et bradykinine humain, et toutes ont  
5 donné des résultats négatifs. Ceci indique que le polypeptide codé par le clone ATIP interagit, de façon sélective, avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris.

#### EXEMPLE 2 : Caractérisation du clone ATIP.

Pour rechercher le clone entier correspondant, une sonde de  
10 354 pb (SEQ ID NO:5), qui correspond à l'insert obtenu par digestion avec l'enzyme de restriction NotI du plasmide isolé en double hybride (celui extrait de la banque VP16, sélectionné comme positif dans le crible utilisant comme appât, l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris), est utilisée pour cribler une banque d'ADNc de fœtus de souris construite avec des inserts de  
15 taille supérieure à 1 kb. Deux clones chevauchants, comprenant la séquence ATIP, ont ainsi été identifiés et ont permis de séquencer 1803 pb de l'ADNc correspondant (SEQ ID NO:1). Cette séquence contient une phase ouverte de lecture de 1323 pb (SEQ ID NO:3) codant potentiellement pour une protéine de 440 acides aminés (SEQ ID NO:2 et 4). Les comparaisons entre la séquence  
20 protéique identifiée et les séquences contenues dans les banques de données indiquent que celle-ci ne présente jamais plus de 25 % d'homologie avec une partie d'une séquence connue.

La sonde de 354 pb (SEQ ID NO:5) a été utilisée comme sonde en Southern et Northern de façon très satisfaisante dans les conditions  
25 d'hybridation ci-après : préhybridation et hybridation en 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à stringence : SSCX1, 0,1 % SDS.

En parallèle, des expériences d'hybridation de Northern blot  
30 effectuées sur des ARN totaux de cellules N1E-115 avec la sonde ATIP (SEQ

ID NO:5) confirment l'expression de l'ARNm correspondant dans les cellules N1E-115, et indique l'existence d'au moins 5 transcrits de tailles différentes. Ces transcrits correspondent à des épissages alternatifs d'un même gène ou à des gènes différents homologues.

5 Sur un Northern, effectué dans les conditions décrites dans la littérature sur un échantillon de 5 µg d'ARN poly A+ de cellules N1E-115, les tailles des différents transcrits hybridant avec la sonde ATIPsouris sont = 2,5-3,5-5-5,3 et 7,5 kb.

La figure 9 représente un Northern blot contenant des ARN  
10 poly A+ de différents tissus humains, hybridés avec la même sonde ATIPsouris. On peut constater que l'ATIP est exprimé de façon ubiquitaire. On trouve dans tous les tissus représentés un transcrit majoritaire à 4,4 kb, auquel s'ajoute, selon les tissus, d'autres transcrits plus longs (pancréas et cœur) ou plus courts (pancréas, muscle squelettique, placenta, cerveau et  
15 cœur). Ceux-ci sont peut-être le fruit d'un épissage alternatif de l'ARN de ATIP qui serait dépendant du tissu considéré ou encore ils sont le signe de l'existence d'une famille d'ARN codant pour des protéines de "la famille ATIP", homologues de ATIP et qui sont révélés par la sonde, à la stringence utilisée.

20 Afin de connaître la taille du plus petit transcrit codant pour l'ATIP, une amplification rapide des extrémités d'ADNc (RACE 5', Marathon cDNA Amplification Kit de Clontech) à partir d'ARN poly A+ de cellules N1E-115 a été réalisé, en utilisant l'oligonucléotide antisens de SEQ ID NO:10, pour amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP endogène  
25 des cellules N1E-115 (neuroblastome murin).

Les résultats obtenus ont indiqué que le plus petit transcrit incluant le domaine ATIP est un ARNm de 1950 pb, qui contient bien le début de la séquence codante obtenue par clonage.

Tout autre couple d'oligonucléotides (amorces) de plus de 20  
30 pb et comprenant une partie de la séquence ATIP, peut également être utilisé



pour amplifier par PCR (conditions de PCR à déterminer pour chaque couple d'oligonucléotides à l'aide du logiciel OLIGO 4) une partie de l'ATIP (et donner un fragment d'ADN qui pourrait éventuellement être utilisé comme sonde pour reconnaître l'ADN ou l'ARN correspondant à l'ATIP).

5 **EXEMPLE 3 : Construction de différents vecteurs selon l'invention**

D'une façon générale les vecteurs contenant ATIPsouris-court (à l'exception de pRSETA-ATIPsouris-court) ont été obtenus à partir d'un insert produit par PCR avec les deux oligonucléotides suivants (SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12):

10 oligo. sens: 5' CGCGGATCCCAGACAGACCGGACGGAAGTGGAG 3'  
oligo. antisens: 5' CCGGAATTCCTACAACCTTTCGTTTAAAGCATC 3',

en utilisant comme matrice le vecteur VP16-ATIPsouris-court (figure 5). Par commodité, ce vecteur est dénommé  $BATIP_{stop,E}$ . En effet, digéré par BamHI et EcoRI, il donne un insert correspondant à la séquence

15  
1er brin: GATCC-SEQ ID NO:5 (moins CAT)-TAGTG  
2ème brin: CCTAG-----CTTAAG  
(STOP)  
Site BamHI Site EcoRI

20

D'autres vecteurs peuvent également être construits; ils comprennent tout ou partie de la protéine ATIP et sont les suivants :

-VP16-ATIPsouris-court (vecteur sorti de la banque criblée en double hybride, comprend 354 pb (SEQ ID NO:5), insérées en NotI dans  
25 VP16).

-pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court (insert  $BATIP_{stop,E}$ , inséré en BamHI-EcoRI dans pCDNA3-MYC (pcDNA3 d'Invitrogen, modifié par insertion de la séquence MYC, figure 7); ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires. Il permet d'exprimer MYC-ATIPsouris-  
30 court en cellules eucaryotes. L'expression de cette protéine dans des cellules eucaryotes après transfection du plasmide correspondant a déjà été obtenue et vérifiée par immunoréaction avec un anticorps anti-MYC et anti-ATIP.

-pRSETA-HIS-ATIPsouris-court (insert <sup>B</sup>ATIP<sub>cstop</sub>,E. inséré en BamHI-EcoRI dans pRSETA, Invitrogen). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine de fusion HIS-ATIPsouris-court en cellules bactériennes et de la purifier sur colonne de Nickel (Voir figure 6 pour le site multiple de clonage).

5        -pBacPAK-polyHIS-ATIPsouris-court (insert <sup>B</sup>ATIP<sub>cstop</sub>,E. inséré en BamHI-EcoRI dans le vecteur pBacPAK-polyHIS (pBacPAK commercial, modifié par insertion d'une séquence contenant un tag histidine et un site de clivage à la thrombine, figure 8). Cette construction peut être utilisée pour exprimer la protéine ATIP souris-court, fusionnée à un tag histidine, dans des cellules d'insectes (type SF9). En effet, comme il est indiqué, ce  
10        vecteur contient une insertion poly-histidine et peut donc coder pour la protéine de fusion. Celle-ci, de même que la protéine de fusion clonée dans pRSET, peut-être purifiée sur colonne de Nickel et servir au même type de techniques.

15        -pGEX-4T1-GST-ATIPsouris-court (insert amplifié par PCR identique à <sup>B</sup>ATIP<sub>cstop</sub>,E. mais sans codon STOP, ce qui prolonge la séquence de ATIPsouris-court des quelques acides aminés suivants: Phe-Glu-Phe-Pro-Gly-Arg-Leu-Glu-Arg-Pro-His-Arg-Asp provenant du plasmide pGEX-4T-1 (Pharmacia). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine GST-ATIPsouris-court en cellules bactériennes et de la purifier sur billes glutathion-agarose.  
20

      -pCDNAI-ATIPsouris clone1 (totalité du 5' séquencé de ATIP et ORF jusqu'à pb: 1205 en partant du début du clone, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide est issu du clonage de la banque de foetus de souris avec la sonde SEQ ID NO:5. Ce plasmide peut servir à produire en bactéries,  
25        la portion 5' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

      -pCDNAI-ATIPsouris clone 2 (2ème moitié de l'ORF de ATIP à partir de pb: 616 et jusqu'à la fin du 3' séquencé (pb 1803), inséré en BstXI dans pCDNAI, Invitrogen). Ce plasmide peut servir à produire en bactéries, la portion 3' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

30        -pCDNAI-ATIPsouris-long (clones 1 et 2 mis bout à bout, en

utilisant le site intermédiaire SapI. Ce plasmide contient la totalité du clone ATIP souris, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide peut être utilisé en transfections transitoires en cellules eucaryotes.

-pcDNA3-ATIPsouris-long (ATIPsouris entier sorti BamHI-XbaI de pCDNAI-ATIPsouris-long, et inséré dans pcDNA3, Invitrogen, à ces mêmes sites). Ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires en cellules eucaryotes. Il a permis de traduire *in vitro* (kit TNT T7 coupled reticulocytes lysate systems, Promega) la protéine ATIP entière et de constater que son produit de traduction a un poids moléculaire apparent sur gel de 58 kDa. A ce produit majoritaire s'ajoute deux produits minoritaires de 30 et 15 kDa. D'après la séquence de ATIP, ceux-ci pourraient correspondre à des produits partiels de traduction *in vitro* commençant à d'autres ATG que celui en position 178 de la SEQ ID NO:1.

**EXEMPLE 4 :** Obtention de clones stables exprimant la protéine ATIPsouris-court ou long.

On a obtenu par transfection des clones stables exprimant à la fois le récepteur AT2 humain et l'ATIP souris court (SEQ ID NO:6) ou l'ATIP souris long (SEQ ID NO:3).

Les cellules CHO, déficientes en dihydrofolate réductase, sont transfectées avec un plasmide contenant la région codant pour le récepteur AT2 humain (Bedecs et al., *Biochem. J.* 1997, 325, 449-454).

Le clone sélectionné, CHO-hAT2, exprimant 100 fmol de récepteur AT2/mg de protéine, est cultivé sur milieu HAMF12 complémenté avec du sérum de veau fœtal à 10 % et utilisé entre les passages 10 et 30.

Ce clone a lui même été transfecté avec les plasmides pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court ou pCDNA3-ATIPsouris-long décrits à l'exemple 3. La sélection des clones exprimant, de manière stable, la protéine ATIP (forme courte ou forme longue) s'est faite en milieu sélectif contenant 800 µg/ml de G418. Les lysats cellulaires, correspondant aux différents clones sélectionnés, ont été soumis à un SDS-PAGE suivi d'une immuno-empreinte et

celui-ci a été incubé avec l'anticorps polyclonal anti-ATIP. Les résultats obtenus indiquent que différents clones exprimant des taux différents d'ATIP souris court, ont pu être obtenus.

**EXEMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la séquence**

5 **SEQ ID NO:6.**

Afin de progresser dans la caractérisation de ce clone, la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre le domaine ATIP a été entreprise.

Pour cela, un vecteur codant pour une protéine correspondant  
10 à ce domaine fusionné à six résidus histidine a été construit.

La séquence suivante :

GGA TCC-SEQ NO:5-TAG-TGA-ATT

est insérée dans le plasmide pRSETA, tel que défini ci-dessus.

Dans cet insert, la SEQ ID NO:5 ne comprend pas le premier  
15 CAT.

Le plasmide obtenu est exprimé dans la souche d'*E. coli* BL 21 (DE3) ( $F^-$  ompT $^-$  rB $^-$  mB $^-$ ) contenant le bactériophage DE3 qui porte un fragment d'ADN contenant le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5*, le début du gène *lacZ* et le gène codant pour la T7 ARN polymérase. Ce fragment est introduit  
20 dans le gène *int*.

En présence de DE3, seul le promoteur *lacUV5*, inductible par IPTG dirige la transcription de la T7 ARN polymérase.

L'addition de 0,4 mM d'IPTG à une culture de cellules BL21 (DE3) induit la production de T7 ARN polymérase qui, à son tour, entraîne la  
25 transcription de l'ADN cible du plasmide pRSETA (permettant la traduction de la protéine se liant au récepteur AT2).

La protéine obtenue (17 kDa) est purifiée sur colonne de Nickel (Ni-NTA, QuiAexpressionist 07/97, Quiagen), grâce à l'affinité de ses six résidus histidine pour le nickel. La protéine obtenue est ensuite injectée à  
30 des lapins pour obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine

ATIP. Les saignées obtenues présentent un très bon titre.

Ces anticorps purifiés sur colonne de GST-ATIP, après passage sur colonne de GST seul (afin d'éliminer les éventuels anticorps spécifiques de GST et de ne retenir sur la colonne de GST-ATIP que les anticorps spécifiques de ATIPsouris-court) peuvent être utilisés avec succès pour immuno-précipiter et révéler en immuno-empreinte MYC-ATIPsouris-court à partir de cellules COS transfectées de façon transitoire. De plus cet anticorps purifié révèle également en immuno-empreinte la protéine ATIPsouris-long contenue dans des lysats de cellules COS transitoirement transfectées avec le plasmide pCDNA3-ATIPsouris-long.

La protéine ATIPsouris-long transfectée est visualisée après SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-ATIP, sous la forme de deux polypeptides de poids moléculaires apparents de 50 et 45 kDa.

Cet anticorps purifié a été utilisé en immuno-fluorescence sur des cellules CHO-hAT2, fixées par un traitement de 15 minutes en paraformaldéhyde (3 %). Après fixation, les cellules sont traitées successivement par des solutions de PBS/glycine 50 mM pendant 20 minutes, PBS/Triton X100 0,1 % pendant 5 minutes et PBS/BSA 0,2 % pendant 15 minutes. Elles sont ensuite incubées successivement dans des solutions à 15 µg/ml d'anticorps contenant l'anticorps anti-ATIP purifié, puis l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à de la rhodamine pendant 30 minutes. Entre chaque nouvelle incubation, trois rinçages en PBS sont effectués. Les observations au microscope à fluorescence indiquent une expression de la protéine ATIP endogène au niveau du noyau (de façon majoritaire) et du cytoplasme des cellules CHO-hAT2.

Certaines cellules montrent une répartition homogène de la fluorescence due à l'anticorps anti-ATIP dans ces compartiments, alors que d'autres cellules qui paraissent plus étalées, montrent une répartition hétérogène de la fluorescence le long de filaments qui semblent partir du noyau et s'étendre jusqu'à la membrane plasmique de la cellule, en un réseau organisé.

Des expériences complémentaires de co-localisation doivent être effectuées pour déterminer si ces filaments coïncident ou non avec des structures connues du cytosquelette.

**EXEMPLE 6 : Confirmation de l'interaction *in vitro* de la protéine**

**5 ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2.**

Pour démontrer l'interaction de la protéine ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 dans un autre système que celui du double hybride, un protocole permettant de mettre en évidence cette interaction *in vitro* a été mis en place. Pour cela, la protéine de fusion GST-  
10 ATIP telle que décrite ci-dessus a été produite ; elle est associée par sa partie GST à de la glutathione couplée à des billes d'agarose (GA). En parallèle, des bactéries (DH5 $\alpha$ ) sont transfectées avec un plasmide (pMAL-c2-AT2, issu de pMAL-c2 de New England Biolabs) codant pour une protéine de fusion entre l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 humain (Asn314-Ser363) et la MBP  
15 (Maltose Binding Protein). Ces bactéries ont été cultivées et la protéine de fusion a été induite en IPTG 0,3 mM selon le protocole "*pMAL Protein Fusion and Purification System*" de New England Biolabs. Après centrifugation de la culture à 4 000 g et solubilisation du culot obtenu en "*column buffer*" (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA), une nouvelle centrifugation à 9 000 g a  
20 permis de récupérer un surnageant contenant une forte concentration de MBP-AT2. Ce surnageant a été mis en contact, pendant 3 heures à 4°C, avec les billes de glutathione agarose couplées à la protéine GST seule après addition de NaCl de façon à se placer à 300 mM final NaCl. Cette étape de préincubation permet d'éliminer les interactions non spécifiques qui peuvent exis-  
25 ter entre ATIP et GA-GST. Le surnageant récupéré a été mis en contact avec les billes GA-GST-ATIPsouris-court ou GA-GSTseul pendant une nuit à 4°C. Après contact les billes ont été rincées 3 fois en tampon 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA et une fois en "*column buffer*". Après analyse des billes rincées en SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-MBP  
30 (New England Biolabs), on observe une rétention spécifique de la protéine

MBP-AT2 sur billes GA-GST-ATIPsouris-court qui n'est pas observée sur les billes GA-GSTseul (Figure 10).

Ce même protocole a été réalisé avec un plasmide exprimant MBP-AT1 (extrémité C-terminale du récepteur AT1 humain (Leu297-Glu359)) et indique que la protéine MBP-AT1 n'est pas retenue de façon spécifique sur les billes GA-GST-ATIPsouris-court (Figure 10).

Ces résultats confirment ceux obtenus en double hybride indiquant une interaction spécifique et sélective entre la protéine selon l'invention et l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 ( et pas AT1).

10 **EXEMPLE 7 : Modification de la transduction du signal du récepteur AT2 dans des clones surexprimant la protéine ATIPsouris-long.**

Afin de vérifier que la protéine ATIP interagit *in vivo* avec le récepteur AT2, on a évalué si une surexpression de cette protéine modifie un signal induit par le récepteur AT2.

15 Pour cela un clone stable de cellules CHO-hAT2 exprimant la protéine ATIPsouris-long (CHO-hAT2-ATIP), obtenu selon la méthodologie décrite dans l'exemple 4 a été utilisé ; le test fonctionnel de l'activité du récepteur AT2 mis au point sur le clone CHO-hAT2 qui consiste à inhiber la phosphorylation de la sous-unité IR $\beta$  du récepteur de l'insuline induite par son ligand, a été reproduit.

Mise en évidence d'une inhibition par le récepteur AT2 de la phosphorylation d'IR $\beta$  induite par l'insuline dans les cellules CHO-hAT2 :

Les cellules CHO-hAT2 sontensemencées à une densité de 3.10<sup>6</sup> cellules par boîte de 15 cm<sup>2</sup> de diamètre. Elles sont rendues quiescentes par un sevrage de 16 heures avant d'être traitées. Le traitement consiste en une mise en contact de 5 minutes avec 15 ml de milieu F12 contenant de l'insuline additionné ou non de CGP42112 (agoniste sélectif du récepteur AT2). Après traitement, les cellules sont solubilisées en tampon de lyse contenant : 50 mM Hepes, pH 7.6, 1 % Triton X-100, 20 mM EDTA, 30 mM pyrophosphate de sodium, 30 mM fluorure de sodium, 2 mM benzamidine, 1 mM

30

sodium orthovanadate, 1 mM fluorure de phénylméthylsulphonyle et 1 µg/ml d'aprotinine, pepstatine, antipain et leupeptine. Les lysats sont ensuite soumis à une purification sur colonne de lectine de germe de blé selon le protocole décrit dans Issad, T., et al. (*Eur. J. Biochem.* 1995, 234, 108-115). Après  
5 mise en contact et lavages, les billes de lectine couplée à de la sépharose (Pharmacia) sont reprises dans du tampon d'échantillon contenant du SDS et les protéines éluées sont analysées en SDS-PAGE suivie d'immuno-empreintes avec des anticorps anti-phosphotyrosine (Upstate Biotechnology, Inc.) ou anti-IRβ (décrit dans Issad, T., et al., précité).

10 La sous-unité β du récepteur de l'insuline apparaît comme un polypeptide de 97 kDa dont la phosphorylation (visualisée par révélation avec un anticorps anti-phosphotyrosine) augmente de façon dose-dépendante avec la concentration en insuline. L'angiotensine II (100 nM) ainsi que le CGP42112 (100 nM) inhibent cette phosphorylation à toutes les doses d'insuline testées  
15 entre 0,1 et 0,001 µg/ml (Figure 11). A titre d'exemple, le CGP42112 inhibe la phosphorylation de IRβ induite par 0,01 µg/ml d'un facteur  $64 \pm 4$  % (n=7). Ce résultat démontre que le récepteur AT2 interfère négativement sur les voies de signalisation du récepteur de l'insuline à l'étape initiale de son activation, qui est son autophosphorylation. Ces résultats fournissent également la  
20 première mise en évidence d'une interconnection entre les voies de signalisation des récepteurs tyrosines kinases et le récepteur à sept domaines transmembranaires qu'est l'AT2.

#### Reproduction de cette méthodologie sur les cellules CHO-hAT2-ATIP :

25 Lorsque ce protocole est réalisé sur des cellules CHO-hAT2-ATIP, l'inhibition par le CGP42112 (100 nM) de la phosphorylation du récepteur de l'insuline obtenue pour différentes doses d'insuline (0,05, 0,01, 0,005, 0,001 µg/ml) n'est pas observée (Figure 11). Ce résultat a été reproduit 3 fois pour chacune des doses d'insuline en prenant comme contrôle  
30 positif, dans chaque expérience, l'inhibition obtenue pour le clone CHO-hAT2.



Ceci démontre donc que la surexpression de la protéine ATIP dans les cellules CHO-hAT2 interfère avec la signalisation du récepteur AT2, ce qui confirme l'interaction *in vivo* de la protéine ATIP avec le récepteur AT2.

Une autre protéine glycosylée, retenue sur colonne de lectine, 5 ayant un poids apparent de 120 kDa, identifiée comme étant la protéine nouvellement clonée SIRP (Kharitonov, A. et al, Nature, 1997, 386, 181-186) est phosphorylée sur tyrosine en réponse à l'insuline. La phosphorylation de cette protéine, de même que celle de IR $\beta$  est inhibée en présence de CGP42112 dans le cas du clone CHO-hAT2 et ne l'est pas dans le cas du clone 10 CHO-hAT2-ATIP. Ceci confirme que la protéine ATIP interfère sur les voies de signalisation du récepteur AT2. Ces résultats montrent bien l'intérêt que peut présenter l'utilisation de la protéine ATIP pour modifier la signalisation médiée par le récepteur AT2 et compenser éventuellement des pathologies associées à des anomalies de la régulation de ce récepteur.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en évidence, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente 20 invention.

REVENDECATIONS

1°) Fragment d'acides nucléiques isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9.

5           2°) Fragment d'une des séquences selon la revendication 1, comprenant entre 20 et 400 pb, utile comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9, ou de séquences homologues.

10           3°) Fragment selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend de 20 pb à 400 pb incluses dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

4°) Fragment selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12.

15           5°) Transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires des séquences selon la revendication 1.

6°) Protéine purifiée et isolée, apte à interagir avec le récepteur AT2, sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8, laquelle protéine est dénommée ATIP.

20           7°) Produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique selon la revendication 1.

8°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine ou un fragment de protéine selon la revendication 6 ou la revendication 7.

25           9°) Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon la revendication 1.

10°) Cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur selon la revendication 9.

30           11°) Cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles

sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au moins deux vecteurs qui codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la  
5 revendication 7 et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par  
10 un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le  
15 domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

12°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-  
20 transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au  
25 moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs  
30 comportent en outre des marqueurs de sélection.

13°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

14°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

15°) Méthode de sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant

à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

(b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

16°) Méthode de criblage de polypeptides interagissant avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

(b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur

un milieu sélectif convenable.

17°) Méthode de caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5 (a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un  
10 fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des  
15 marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou selon la revendication 7-récepteur AT2.

20 18°) Méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support avec une protéine de fusion  
25 récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

(c) la visualisation de l'éventuelle interaction protéine ATIP  
30 selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, en particulier en

SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés contre la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2.

19°) Méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable,

10 (c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps appropriés et

(d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagissant avec la protéine ATIP.

15 20°) Utilisation des cellules co-transformées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la sélection et le criblage de substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNOLOGIE  
MOLECULAIRE-ADIM  
(B) RUE: 22 rue Méchain  
(C) VILLE: Paris  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75014

(A) NOM: ELBAZ Nathalie  
(B) RUE: 7 Passage des Italiens  
(C) VILLE: Bagnolet  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 93170

(A) NOM: NAHMIAS Clara  
(B) RUE: 4 rue Bailly  
(C) VILLE: Paris  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75003

(A) NOM: STROSBERG Arthur Donny  
(B) RUE: 66 rue de Javel  
(C) VILLE: Paris  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L'INVENTION: SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR TOUT OU  
PARTIE D'UNE PROTEINE INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2 ET LEURS  
APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1803 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC



## (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLEMMENT:178..1500

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCTACCCCCC	CCCCACGCAC	CCCCCAATCT	GGGTGGCCTG	GCATTAGCAT	GTAAGCTTGT	60
TTTTCTCTGG	CTGTATCTCT	TGGCCTGGAA	GAACCCCGAG	TTGCCAAGAG	ACACAGTATG	120
TGATGGTCCC	TGAAAAAGCT	GCTTCCCCTG	CGAAGTTCTC	CCACTGGCTT	CGAAGAC	177
ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA	225					
Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Val Arg Leu						
1 5 10 15						
ACC GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT CCT TCG GGG CTC AGG	273					
Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg						
20 25 30						
AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG CAG AAG AAT	321					
Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn						
35 40 45						
CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG TCC	369					
Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser						
50 55 60						
TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC	417					
Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser						
65 70 75 80						
CAA AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC	465					
Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn						
85 90 95						
AAC AAG TTT GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG	513					
Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu						
100 105 110						
CGG GAG GAA GCA CTG AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC	561					
Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val						
115 120 125						
AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA	609					
Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu						
130 135 140						
GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG	657					
Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln						
145 150 155 160						

AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG	705
Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg	
165 170 175	
CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC	753
Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr	
180 185 190	
ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC	801
Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp	
195 200 205	
AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC	849
Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser	
210 215 220	
CAC TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT	897
His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu	
225 230 235 240	
TCA GAA ATC AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT	945
Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp	
245 250 255	
CTG CTT AAT GAG AAG CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG	993
Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu	
260 265 270	
AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA	1041
Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln	
275 280 285	
AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG	1089
Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met	
290 295 300	
TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT GTG TTA GAG ATC AAG	1137
Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys	
305 310 315 320	
AAT GAG AAG CTG CAC CAG CAG GAC ATG AAG CTA ATG AAG ATG GAA AAG	1185
Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys	
325 330 335	
CTG GTG GAC AAT AAC ACA GCA TTG GTT GAC AAG CTG AAG CGA TTC CAG	1233
Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln	
340 345 350	
CAG GAA AAC GAG GAG TTA AAA GCT CGC ATG GAC AAA CAC ATG GCA ATT	1281
Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile	
355 360 365	
TCA AGG CAA CTT TCC ACC GAG CAG GCC GCG CTG CAA GAG TCC CTT GAG	1329
Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu	
370 375 380	

AAG GAG TCA AAG GTC AAC AAG AGA CTG TCC ATG GAG AAC GAG GAA CTT 1377  
 Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu  
 385 390 395 400  
 CTG TGG AAA CTG CAC AAC GGA GAC CTG TGC AGC CCC AAG AGA TCC CCC 1425  
 Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro  
 405 410 415  
 ACC TCC TCG GCC ATC CCT TTC CAG TCC CCC AGG AAT TCT GGT TCC TTC 1473  
 Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe  
 420 425 430  
 TCC AGC CCC AGC ATC TCA CCC AGA TGA CGGCTTCTGA ACGCAGGAGA 1520  
 Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg \*  
 435 440  
 CTCTCTGAAG GCACTGAGGT GCGCTTCTGC AGGACTGACC CTCTCATGGG AACTCGAGTT 1580  
 GCTGCGTTAG CTCTCTGGAA TATCCCCAGG ATATCGGGAG AGCAGCCGCC AACCGTATCA 1640  
 GCTACGTACG AATAGAGAGC TCCAATAGAA GACTTTTAAAC TTGGTCCAAA AGCCTCCTCC 1700  
 AAAACAGAT TTCGGAAGT AAGTGGACAT AGTTGCACAA AGCACTTACG GAACGAGGGA 1760  
 ACCTTGTTCT TTGCCTTCCT TCACCTAAGC ATAGGCTTTC CAG 1803

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 440 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Val Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg  
 20 25 30  
 Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn  
 35 40 45  
 Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser  
 50 55 60  
 Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn  
 85 90 95

Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu  
 100 105 110  
 Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val  
 115 120 125  
 Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu  
 130 135 140  
 Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg  
 165 170 175  
 Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr  
 180 185 190  
 Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp  
 195 200 205  
 Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser  
 210 215 220  
 His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp  
 245 250 255  
 Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln  
 275 280 285  
 Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met  
 290 295 300  
 Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln  
 340 345 350  
 Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile  
 355 360 365  
 Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu  
 370 375 380

Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro  
 405 410 415  
 Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe  
 420 425 430  
 Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg \*  
 435 440

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1323 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT:1..1322

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA	48
Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Val Arg Leu	
ACC GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT CCT TCG GGG CTC AGG	96
Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Leu Arg	
AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG CAG AAG AAT	144
Lys Asn Thr Val Ile Phe His Thr Val Glu Lys Gly Arg Gln Lys Asn	
CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG TCC	192
Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Thr Gln Thr Ala Pro Asp Val Leu Ser	
TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC	240
Ser Glu Arg Thr Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Ser	
CAA AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC	288
Gln Ser Gly Phe Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Leu Ser Arg Gly Asn	
AAC AAG TTT GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG	336
Asn Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu	
CGG GAG GAA GCA CTG AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC	384
Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val	

AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA Ser Leu Arg Gly Glu Leu Val Ala Ala Ser Ser Ala Cys Glu Lys Leu	432
GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG Glu Lys Ala Arg Ala Asp Leu Gln Thr Ala Tyr Gln Glu Phe Val Gln	480
AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG Lys Leu Asn Gln Gln His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg	528
CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC Leu Lys Asp Leu Tyr Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr	576
ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp	624
AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser	672
CAC TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu	720
TCA GAA ATC AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp	768
CTG CTT AAT GAG AAG CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu	816
AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln	864
AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met	912
TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT GTG TTA GAG ATC AAG Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys	960
AAT GAG AAG CTG CAC CAG CAG GAC ATG AAG CTA ATG AAG ATG GAA AAG Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys	1008
CTG GTG GAC AAT AAC ACA GCA TTG GTT GAC AAG CTG AAG CGA TTC CAG Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln	1056
CAG GAA AAC GAG GAG TTA AAA GCT CGC ATG GAC AAA CAC ATG GCA ATT Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile	1104
TCA AGG CAA CTT TCC ACC GAG CAG GCC GCG CTG CAA GAG TCC CTT GAG Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu	1152
AAG GAG TCA AAG GTC AAC AAG AGA CTG TCC ATG GAG AAC GAG GAA CTT Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu	1200
CTG TGG AAA CTG CAC AAC GGA GAC CTG TGC AGC CCC AAG AGA TCC CCC Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro	1248

ACC TCC TCG GCC ATC CCT TTC CAG TCC CCC AGG AAT TCT GGT TCC TTC 1296  
 Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe

TCC AGC CCC AGC ATC TCA CCC AGA TG A 1323  
 Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 440 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Val	Arg	Leu	1	5	10	15
Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Leu	Arg	20	25	30	
Lys	Asn	Thr	Val	Ile	Phe	His	Thr	Val	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Lys	Asn	35	40	45	
Pro	Arg	Ser	Leu	Cys	Ile	Gln	Thr	Gln	Thr	Ala	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	50	55	60	
Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Glu	Leu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Thr	Lys	Cys	Glu	Ser	65	70	75	80
Gln	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	His	Leu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	Asn	85	90	95	
Asn	Lys	Phe	Glu	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Ile	Gln	His	Leu	Leu	Ser	Glu	100	105	110	
Arg	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln	His	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Val	115	120	125	
Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Cys	Glu	Lys	Leu	130	135	140	
Glu	Lys	Ala	Arg	Ala	Asp	Leu	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gln	Glu	Phe	Val	Gln	145	150	155	160
Lys	Leu	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Glu	Leu	Glu	Asn	Arg	165	170	175	
Leu	Lys	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Tyr	180	185	190	
Ile	Glu	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Glu	Gln	Phe	Asp	195	200	205	

Asn Leu Asn Ala Ala His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser  
 210 215 220  
 His Ser Glu Lys Val Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Ile Lys Lys Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp  
 245 250 255  
 Leu Leu Asn Glu Lys Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Lys Ser Glu Asn Asp Ala Leu Asn Glu Arg Leu Lys Ser Glu Glu Gln  
 275 280 285  
 Lys Gln Leu Ser Arg Glu Lys Ala Asn Ser Lys Asn Pro Gln Val Met  
 290 295 300  
 Tyr Leu Glu Gln Glu Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Lys Leu His Gln Gln Asp Met Lys Leu Met Lys Met Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Val Asp Asn Asn Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln  
 340 345 350  
 Gln Glu Asn Glu Glu Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile  
 355 360 365  
 Ser Arg Gln Leu Ser Thr Glu Gln Ala Ala Leu Gln Glu Ser Leu Glu  
 370 375 380  
 Lys Glu Ser Lys Val Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Trp Lys Leu His Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro  
 405 410 415  
 Thr Ser Ser Ala Ile Pro Phe Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe  
 420 425 430  
 Ser Ser Pro Ser Ile Ser Pro Arg  
 435 440

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC



## (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..354

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAT CAG ACA GAC CGG ACG GAA CTG GAG AAC CGG CTG AAG GAC TTA TAC	48
His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg Leu Lys Asp Leu Tyr	
ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG AGC ATT TAC ATT GAG GAG GCA GAA	96
Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr Ile Glu Glu Ala Glu	
AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT GAC AAC TTA AAC GCC GCC	144
Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala Ala	
CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC CAC TCG GAG AAG GTG	192
His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Val	
GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT TCA GAA ATC AAG AAG	240
Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys	
AGC CAT GAG ATG GAG AAG AAG TCA CTG GAG GAT CTG CTT AAT GAG AAG	288
Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Asn Glu Lys	
CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAC GAT	336
Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp	
GCT TTA AAC GAA AGG TTG	354
Ala Leu Asn Glu Arg Leu	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 118 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

His Gln Thr Asp Arg Thr Glu Leu Glu Asn Arg Leu Lys Asp Leu Tyr	
1 5 10 15	
Thr Ala Glu Cys Glu Lys Leu Gln Ser Ile Tyr Ile Glu Glu Ala Glu	
20 25 30	
Lys Tyr Lys Thr Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala Ala	
35 40 45	
His Glu Thr Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Val	
50 55 60	

11

Glu Leu Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys  
 65 70 75 80

Ser His Glu Met Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Asn Glu Lys  
 85 90 95

Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp  
 100 105 110

Ala Leu Asn Glu Arg Leu  
 115

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 3742 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 293..1600

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAGTGTGATG TGGTTCAGAG GCAGCTTCTA GACCTGCAGG AGGGAGATTG TATTCAGAGG 60

AAGAGCATCA TTTTGGCAAC ATCTGAAAGT GAAAACGGAA GCCAGAAACA CTTGGCCAGC 120

CCTGGGGGAT TTTTCTTCTC TATGCCTCTG TGGTGGAATG ACATTTGCTG TGTAGGCATC 180

TTTCCTCTGA CTGTATTTCT TGGCCTTGAA GAGTACTGAG TTTAAAAAGA CAGTATGTGA 240

CAGTCCATGG AAATTGCCTC TTCTGTGAAA TCTCGCCACC TGCTCCGAAG AC ATG 295  
 Met

TTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA TCC ACC ATT CAC ATA CGA CTG ACG 343  
 Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Ile Arg Leu Thr

GCC AAA GGA TTG CTT CGA AAC CTT CGA CTT CCT TCA GGG TTT AGG AGA 391  
 Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Phe Arg Arg

AGC ACT GTT GTT TTC CAC ACA GTT GAA AAG AGC AGG CAA AAG AAT CCT 439  
 Ser Thr Val Val Phe His Thr Val Glu Lys Ser Arg Gln Lys Asn Pro

CGA AGC TTA TGT ATC CAG CCA CAG ACA GCT CCC GAT GCG CTG CCC CCT 487  
 Arg Ser Leu Cys Ile Gln Pro Gln Thr Ala Pro Asp Ala Leu Pro Pro

GAG AAA ACA CTT GAA TTG ACG CAA TAT AAA ACA AAA TGT GAA AAC CAA 535  
 Glu Lys Thr Leu Glu Leu Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Asn Gln

AGT GGA TTT ATC CTG CAG CTC AAG CAG CTT CTT GCC TGT GGT AAT ACC Ser Gly Phe Ile Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Ala Cys Gly Asn Thr	583
AAG TTT GAG GCA TTG ACA GTT GTG ATT CAG CAC CTG CTG TCT GAG CGG Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu Arg	631
GAG GAA GCA CTG AAA CAA CAC AAA ACC CTA TCT CAA GAA CTT GTT AAC Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val Asn	679
CTC CGG GGA GAG CTA GTC ACT GCT TCA ACC ACC TGT GAG AAA TTA GAA Leu Arg Gly Glu Leu Val Thr Ala Ser Thr Thr Cys Glu Lys Leu Glu	727
AAA GCC AGG AAT GAG TTA CAA ACA GTG TAT GAA GCA TTC GTC CAG CAG Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gln Thr Val Tyr Glu Ala Phe Val Gln Gln	775
CAC CAG GCT GAA AAA ACA GAA CGA GAG AAT CGG CTT AAA GAG TTT TAC His Gln Ala Glu Lys Thr Glu Arg Glu Asn Arg Leu Lys Glu Phe Tyr	823
ACC AGG GAG TAT GAA AAG CTT CGG GAC ACT TAC ATT GAA GAA GCA GAG Thr Arg Glu Tyr Glu Lys Leu Arg Asp Thr Tyr Ile Glu Glu Ala Glu	871
AAG TAC AAA ATG CAA TTG CAA GAG CAG TTT GAC AAC TTA AAT GCG CAT Lys Tyr Lys Met Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala His	919
GAA ACC TCT AAG TTG GAA ATT GAA GCT AGC CAC TCA GAG AAA CTT GAA Glu Thr Ser Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Leu Glu	967
TTG CTA AAG AAG GCC TAT GAA GCC TCC CTT TCA GAA ATT AAG AAA GGC Leu Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Ala Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys Gly	1015
CAT GAA ATA GAA AAG AAA TCG CTT GAA GAT TTA CTT TCT GAG AAG CAG His Glu Ile Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ser Glu Lys Gln	1063
GAA TCG CTA GAG AAG CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAT GAT GCT Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp Ala	1111
TTA AAT GAA AAA TTG AAA TCA GAA GAA CAA AAA AGA AGA GCA AGA GAA Leu Asn Glu Lys Leu Lys Ser Glu Glu Gln Lys Arg Arg Ala Arg Glu	1159
AAA GCA AAT TTG AAA AAT CCT CAG ATC ATG TAT CTA GAA CAG GAG TTA Lys Ala Asn Leu Lys Asn Pro Gln Ile Met Tyr Leu Glu Gln Glu Leu	1207
GAA AGC CTG AAA GCT GTG TTA GAG ATC AAG AAT GAG AAA CTG CAT CAA Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys Asn Glu Lys Leu His Gln	1255
CAG GAC ATC AAG TTA ATG AAA ATG GAG AAA CTG GTG GAC AAC AAC ACA Gln Asp Ile Lys Leu Met Lys Met Glu Lys Leu Val Asp Asn Asn Thr	1303
GCA TTG GTT GAC AAA TTG AAG CGT TTC CAG CAG GAG AAT GAA GAA TTG Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln Gln Glu Asn Glu Glu Leu	1351
AAA GCT CGG ATG GAC AAG CAC ATG GCA ATC TCA AGG CAG CTT TCC ACG Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile Ser Arg Gln Leu Ser Thr	1399

GAG CAG GCT GTT CTG CAA GAG TCG CTG GAG AAG GAG TCG AAA GTC AAC 1447  
Glu Gln Ala Val Leu Gln Glu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Lys Val Asn

AAG CGA CTC TCT ATG GAA AAC GAG GAG CTT CTG TGG AAA CTG CAC AAT 1495  
Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu Leu Trp Lys Leu His Asn

GGG GAC CTG TGT AGC CCC AAG AGA TCC CCC ACA TCC TCC GCC ATC CCT 1543  
Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ile Pro

TTG CAG TCA CCA AGG AAT TCG GGC TCC TTC CCT AGC CCC AGC ATT TCA 1591  
Leu Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe Pro Ser Pro Ser Ile Ser

CCC AGA TGA CACGTCCCCA AAGTCCACAG ACTCTCTGAA AGCATTTTGA 1640  
Pro Arg \*

TGCAGGTCTG CAGGACTGAC CCCAAGGAGG AACGTGGGCA CAAGAGGTAT ATCAGCACAC 1700

GTGTGATCAC CGTAGGTAAC TGGAGCGTCA CCACCGGCGG AATCGAGCTT CTGAGACTGG 1760

AAGTCTGGAG GAAGACTTTT GCCTCCGTCC AAAAGATTCC TCCAAAAAAA GATTTAAAAA 1820

AAGATTTCCG CATCGACACG GACGTTGTTG CACAAAGCAC TTAAAGAACG AGAGCATCTT 1880

GTTTATTGCC TTTTTCACCT AAGCATAAGG GGAAAACTC TCAGGGCCCT ATTAAGATT 1940

ATAACCTTTG TAATGTTCTT CACCACAGAC ACCTTCTTGT GAGTTTTCAG TCTGACTGTG 2000

GGGGTGGGGG GTGTGAATGA AATGGATGTC ACAGAGTGTC ATGTGTCTGA TGCAGCCTCC 2060

TCTGCTGTGT ATTAAATGTC AAAATCTGAA TATATCTGGA TATGTACTAA TCAAATAATA 2120

ATCAATCAAT CAGCATATAC ATTTTCAGCCA AAGCCATAGA AGAAAAAGCA ATAGTTGCTT 2180

GAATTATGAT CATCTACCAC CAACTCTGCT CAGCCCTGTA ACAGGGTAGG GAGAGGGTAT 2240

AACAGGAAGA GCTTTGACTT GTCCCTGTCT ATACATTCTC TGTATCTTTT GGGGGTAACT 2300

TCTTGGCAGT TTTTCAGTGT TCAGCCATGT CAGTTGAAAC TAGATTTTTC TGTAGATTTT 2360

TTACTTACCC ATGTGAGCCT AACACTATCC TGTAATTCAT TTTCTCAGGC TATGTGTAAA 2420

TGTAGAACCC TAATTTTTCT ATAAAAAAC AAATAACTA ACTGTGTAAA GAAAGAAAAA 2480

GGGAAGTACC AATGGGTTTT TCCACCTTAT TTTTACCTTT GATCTACCCT TGCAGATTTA 2540

ACCTGTCTTC TTCCCTCCCA TTATTCTCAT TTTCTTTTA CCTTTCTCCA CCATCCAGAG 2600

CCACAAAAGC AAACCTTCTA CCTCCTACCT ACTTTTCTCT GGGACAAGGA TAAAGGAATA 2660

TGATTTTCCA GAGCCCCAGA GCCAGCTCAT CTTCCAGGTG CTGAAACCAC TTTCCAAATA 2720

AACTAAAGCC TGGATTTGAT ATTACAAATT TTGGGAAATC TTAGAATAAA GAACGAGAAC 2780

AAGGAAGTCA TTGGCTAGTA TAATTAAGAA AGGTAGGATT CAGTGCTTAC CGATGATGCA 2840

```

GTACTTGATA GAAGAAAACA GTCTGGGAGG ATAGCGCTCA TTTTTCAGTT ACCCTTTAAG      2900
GAGTCCCTTT GTCTTTGGGA AAGTAGCAGA ATGGTCCGCT TCTTTCCCAT GAGTGGAAAA      2960
TGTGGCTTGT CCAACTCTCC TCCAGGTTGC ATTTTCAGTTT CTTTCCAAAA CTTATTACCT      3020
CCCCTAATCC TGAGACTTTG GAAAAGGTGG AAGGAAGAAC TGTTGCTTTA TCTCCCCCTC      3080
CCTGCATGTG TCAACATTGT GATGTCAGTA TTTACTAATC TACATTCAGT GGCTGTACAA      3140
ATAACAGCTG TAGTAAGAAG AGATTCAGGA TGCTAGAGGT GAATATTTGG GTCATTTACA      3200
TGTACACTAC ATAGCAAGTT GATACTCATG TTGCATGTTC TTTTAAATTA GTGATTTTGT      3260
GTCTTAAGTC TTTAACTTCC AATACTTCAT CATGTATGTA ACCTTCCATG TTTGCTTCTG      3320
ATAAATGGAA ATGTAGGTTT ACTGCCACTT CATGAGATAT CTCTGCTCAC GCTTCCAAGT      3380
TGTTCTCAAT GACATTAGCC AAAGTTGGGT TTGCCATTCA TCCCCTAGGC ATGGTAAATC      3440
TTGTGTTGTT CCCTGCTGTC CTCCGTATTA CGTGACCGGC AAATAAATCT CATAGCAGTT      3500
AATATAAAAC ATCTTTGGAG GATGGGAGAG AACAGGAGGG AAGATGGGAA ACAAATAGA      3560
GAATTCTTAA GATTTTGTGT AAACCAAATG TTTTCATGTAG AATGCAAAAT GTTGGCACGT      3620
CAAAAATATG AATGTGTAGA CAACTGTAGT TGTGCTCAGT TTGTAGTGAT GGGAAGTGTA      3680
TTTTACTCTG ATCAAATAAA TAATGCTGGA ATACTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA      3740
AA                                                                 3742

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 435 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

```

Met Leu Leu Ser Pro Lys Phe Ser Leu Ser Thr Ile His Ile Arg Leu
 1              5              10              15

Thr Ala Lys Gly Leu Leu Arg Asn Leu Arg Leu Pro Ser Gly Phe Arg
          20              25              30

Arg Ser Thr Val Val Phe His Thr Val Glu Lys Ser Arg Gln Lys Asn
          35              40              45

Pro Arg Ser Leu Cys Ile Gln Pro Gln Thr Ala Pro Asp Ala Leu Pro
          50              55              60

```

Pro Glu Lys Thr Leu Glu Leu Thr Gln Tyr Lys Thr Lys Cys Glu Asn  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Gly Phe Ile Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Ala Cys Gly Asn  
 85 90 95  
 Thr Lys Phe Glu Ala Leu Thr Val Val Ile Gln His Leu Leu Ser Glu  
 100 105 110  
 Arg Glu Glu Ala Leu Lys Gln His Lys Thr Leu Ser Gln Glu Leu Val  
 115 120 125  
 Asn Leu Arg Gly Glu Leu Val Thr Ala Ser Thr Thr Cys Glu Lys Leu  
 130 135 140  
 Glu Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gln Thr Val Tyr Glu Ala Phe Val Gln  
 145 150 155 160  
 Gln His Gln Ala Glu Lys Thr Glu Arg Glu Asn Arg Leu Lys Glu Phe  
 165 170 175  
 Tyr Thr Arg Glu Tyr Glu Lys Leu Arg Asp Thr Tyr Ile Glu Glu Ala  
 180 185 190  
 Glu Lys Tyr Lys Met Gln Leu Gln Glu Gln Phe Asp Asn Leu Asn Ala  
 195 200 205  
 His Glu Thr Ser Lys Leu Glu Ile Glu Ala Ser His Ser Glu Lys Leu  
 210 215 220  
 Glu Leu Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Ala Ser Leu Ser Glu Ile Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Gly His Glu Ile Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ser Glu Lys  
 245 250 255  
 Gln Glu Ser Leu Glu Lys Gln Ile Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asn Asp  
 260 265 270  
 Ala Leu Asn Glu Lys Leu Lys Ser Glu Glu Gln Lys Arg Arg Ala Arg  
 275 280 285  
 Glu Lys Ala Asn Leu Lys Asn Pro Gln Ile Met Tyr Leu Glu Gln Glu  
 290 295 300  
 Leu Glu Ser Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Lys Asn Glu Lys Leu His  
 305 310 315 320  
 Gln Gln Asp Ile Lys Leu Met Lys Met Glu Lys Leu Val Asp Asn Asn  
 325 330 335  
 Thr Ala Leu Val Asp Lys Leu Lys Arg Phe Gln Gln Glu Asn Glu Glu  
 340 345 350

16

Leu Lys Ala Arg Met Asp Lys His Met Ala Ile Ser Arg Gln Leu Ser  
 355 360 365  
 Thr Glu Gln Ala Val Leu Gln Glu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Lys Val  
 370 375 380  
 Asn Lys Arg Leu Ser Met Glu Asn Glu Glu Leu Leu Trp Lys Leu His  
 385 390 395 400  
 Asn Gly Asp Leu Cys Ser Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ile  
 405 410 415  
 Pro Leu Gln Ser Pro Arg Asn Ser Gly Ser Phe Pro Ser Pro Ser Ile  
 420 425 430  
 Ser Pro Arg \*  
 435

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1308 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

ATGTTGTTGT CTCCCAAATT CTCCTTATCC ACCATTACACA TACGACTGAC GGCCAAAGGA 60  
 TTGCTTCGAA ACCTTCGACT TCCTTCAGGG TTTAGGAGAA GCACTGTTGT TTTCCACACA 120  
 GTTGAAAAGA GCAGGCAAAA GAATCCTCGA AGCTTATGTA TCCAGCCACA GACAGCTCCC 180  
 GATGCGCTGC CCCCTGAGAA AACACTTGAA TTGACGCAAT ATAAAACAAA ATGTGAAAAC 240  
 CAAAGTGGAT TTATCCTGCA GCTCAAGCAG CTTCTTGCCT GTGTAATAC CAAGTTTGAG 300  
 GCATTGACAG TTGTGATTCA GCACCTGCTG TCTGAGCGGG AGGAAGCACT GAAACAACAC 360  
 AAAACCCTAT CTCAAGAACT TGTTAACCTC CGGGGAGAGC TAGTCACTGC TTCAACCACC 420  
 TGTGAGAAAT TAGAAAAAGC CAGGAATGAG TTACAAACAG TGTATGAAGC ATTCGTCCAG 480  
 CAGCACCAGG CTGAAAAAAC AGAACGAGAG AATCGGCTTA AAGAGTTTTA CACCAGGGAG 540  
 TATGAAAAGC TTCGGGACAC TTACATTGAA GAAGCAGAGA AGTACAAAAT GCAATTGCAA 600  
 GAGCAGTTTG ACAACTTAAA TGCGCATGAA ACCTCTAAGT TGGAAATTGA AGCTAGCCAC 660  
 TCAGAGAAAC TTGAATTGCT AAAGAAGGCC TATGAAGCCT CCCTTTCAGA AATTAAGAAA 720

GGCCATGAAA TAGAAAAGAA ATCGCTTGAA GATTACTTT CTGAGAAGCA GGAATCGCTA 780  
GAGAAGCAAA TCAATGATCT GAAGAGTGAA AATGATGCTT TAAATGAAAA ATTGAAATCA 840  
GAAGAACAAA AAAGAAGAGC AAGAGAAAAA GCAAATTTGA AAAATCCTCA GATCATGTAT 900  
CTAGAACAGG AGTTAGAAAG CCTGAAAGCT GTGTTAGAGA TCAAGAATGA GAAACTGCAT 960  
CAACAGGACA TCAAGTTAAT GAAAATGGAG AACTGGTGG ACAACAACAC AGCATTGGTT 1020  
GACAAATTGA AGCGTTTCCA GCAGGAGAAT GAAGAATTGA AAGCTCGGAT GGACAAGCAC 1080  
ATGGCAATCT CAAGGCAGCT TTCCACGGAG CAGGCTGTTC TGCAAGAGTC GCTGGAGAAG 1140  
GAGTCGAAAG TCAACAAGCG ACTCTCTATG GAAAACGAGG AGCTTCTGTG GAAACTGCAC 1200  
AATGGGGACC TGTGTAGCCC CAAGAGATCC CCCACATCCT CCGCCATCCC TTTGCAGTCA 1260  
CCAAGGAATT CGGGCTCCTT CCCTAGCCCC AGCATTTTAC CCAGATGA 1308

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CAAGCGTTCT CTCGGAGGAC A 21

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CGCGGATCCC AGACAGACCG GACGGAAGTG GAG 33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:



- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGAATTCA CTACAACCTT TCGTTTAAAG CATC